

[ノート]

兵庫県におけるポリオ感染源調査（2002年～2009年）

—健常児の糞便からのウイルス分離—

榎本 美貴^{1*} 高井 伝仕¹ 藤本 嗣人² 近平 雅嗣¹

Polio Virus Surveillance in Hyogo Prefecture from 2002 to 2009

— Virus Isolation from the Stool of Healthy Infants —

Miki ENOMOTO^{1*}, Denshi TAKAI¹, Tsuguto FUJIMOTO², Masatsugu CHIKAHIRA¹

¹ *Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan and* ² *Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases*

Polio virus surveillance was performed under the National Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases to ensure the absence of importation and/or circulation of wild poliovirus and vaccine-derived poliovirus (VDPV). Results of the polio virus surveillance in Hyogo prefecture from 2002 to 2009 were presented. From 571 stool samples of healthy infants between 0 and 6 years of age, one poliovirus, 48 enteroviruses other than poliovirus, one parechovirus and 6 adenoviruses were isolated. Virus was isolated from the 9.8% samples, and the highest virus isolation rate (19%) was recognized at one-year age. The isolated poliovirus was Sabin 3 vaccine strain in the genetic analysis. No wild poliovirus and VDPV were isolated during an 8-year-period in Hyogo prefecture.

I はじめに

ポリオ（急性灰白髄炎）は、ポリオウイルスによる脊髄前角の運動神経細胞の破壊によって起こる四肢の急性弛緩性麻痺を典型的な症状とする疾患である。

WHO（世界保健機関）により1988年からポリオ撲滅計画が始められ、全世界でポリオワクチンの接種が進められてきた。その結果、ポリオ患者数は激減し、2000年には日本を含む西太平洋地域で地域固有の野生株ポリオウイルスの伝播の終息が宣言された。現在、ポリオ常在流行国はアフガニスタン、インド、ナイジェリア、パ

キスタンの4か国にまで減少した¹⁾。しかし、ポリオ流行地から周辺国への野生株ポリオウイルスの輸入感染事例は相次いでおり、これによってポリオ根絶を達成していた多くの地域でポリオが再流行している²⁾。

日本で予防接種に用いられている経口生ワクチンは、稀にワクチン関連ポリオ様麻痺の発生を起こすことがある。また、変異したワクチン由来ポリオウイルス（Vaccine-Derived Poliovirus: VDPV）はポリオの流行を起こすリスクを有しているため、ポリオ対策の新たな課題となっている。VDPVは親株である生ワクチン株と比較してカプシドVP1領域の塩基配列が1%～15%変異したポリオウイルスで³⁾、1%以上の変異は長期間の伝播あるいは持続感染の可能性を示唆している。

厚生労働省の感染症流行予測調査事業は、予防接種事業の効果的な運用と長期的な視野での疾病の流行予測を目的として毎年実施されている⁴⁾。その事業の一環とし

¹ 感染症部 ² 国立感染症研究所

* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
感染症部 榎本 美貴

て、ポリオ感染源調査は、ポリオ流行地域からの野生株ポリオウイルスの輸入、およびVDPVの日本における伝播の可能性を調査することを目的に1962年から始められた。兵庫県も本事業において、健常児の糞便からポリオウイルス分離を行っているが、ポリオウイルス以外のエンテロウイルスなど腸管系ウイルスも分離されることから、これら分離株の性状を毎年継続的に調査している。今回は2002年から2009年の8年間の調査結果を報告する。

II 材料と方法

1. 検査材料

感染症流行予測調査実施要領に基づいて、年次ごとに異なる健康福祉事務所の協力を得て、0歳～1歳、2歳～3歳、4歳～6歳の3年齢層から約20名ずつ、計60名以上の健康な被検者から便の提供を受けた。便はポリオ生ワクチン接種後2か月以上経過した対象者から採取し、8年間に571名について調査した (Table 1)。

Table 1 Number of stool samples from healthy infants

Age (year)	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
0	0	2	1	4	9	12	0	0
1	19	23	15	27	13	11	0	8
2	7	8	10	13	7	10	0	14
3	18	12	16	14	15	9	0	16
4	0	12	11	17	17	7	0	15
5	10	11	8	13	8	12	30	20
6	13	0	0	0	0	5	45	4
Total	67	68	61	88	69	66	75	77

2. 検査方法

感染症流行予測調査事業検査術式⁵⁾に基づいて、糞便からウイルスの分離・同定を行った。

2.1 検体処理

糞便に抗生物質 (ペニシリン 500 U/ml, ストレプトマイシン 500µg/ml) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) とクロロフォルムを加え 10% 乳剤を作製した。20 分間攪拌後、3000 rpm で 20 分間遠心した上清をウイルス分離に用いた。

2.2 細胞と培養液

ウイルス分離には HEp-2 細胞, RD-18S 細胞および L20B 細胞を用いた。細胞増殖には 5% 牛胎児血清 (FBS) を含む D-MEM 培地 (SIGMA), 検体接種後の細胞維持には 2% FBS と抗生物質 (ペニシリン 500 U/ml, ストレプトマイシン 500µg/ml 及びアンホテリシン B2.5µg/ml) を含む D-MEM 培地を用いた。

2.3 ウイルス分離

24 ウェルマイクロプレートに単層培養した細胞の増殖培養液を除いたのち、維持培養液を 1ml 加えた。これに 10% 糞便乳剤の上清 100µl を接種し、35°C の 5% CO₂ インキュベーター中で 7 日間培養した。接種後 24 時間以内に細胞毒性が現れた場合は維持培養液を交換した。7 日間培養後、3 回凍結融解した培養液を、新しく 24 ウェルマイクロプレートに単層培養した細胞に 100µl ずつ接種した。35°C の 5% CO₂ インキュベーター中でさらに 7 日間培養し、計 14 日間観察をして細胞変性効果 (CPE) が現れなければウイルス分離陰性とした。CPE が現れた検体は培養液のウイルス力価を測定した。

2.4 同定試験

分離ウイルスは中和試験で同定した。分離ウイルスに同定用抗血清を等量加えて、35°C で 1~2 時間中和してから、培養細胞に接種して、35°C, 5% CO₂ インキュベーター中で培養、CPE の発現を観察した。抗血清はエンテロウイルスプール抗血清 (デンカ生研), 国立感染症研究所分与のエコーウイルス中和用プール血清 (EP-95) およびアデノウイルス抗血清 (デンカ生研) を用いた。抗血清での型別が行えなかった分離株は、PCR 法⁶⁾で増幅した DNA のダイレクトシーケンス法で得られた塩基配列について BLAST による相同性検索により同定した。

ポリオウイルスと同定された株は、VP1 領域について PCR-RFLP 法で型内株鑑別を行った。

III 結果および考察

1. ウイルスの分離結果

2002 年~2009 年に採取された糞便 571 検体から 56 株のウイルスが分離された。このうち、ポリオウイルスは 1 株で、これは Sabin 3 型のワクチン株であった。その他にエンテロウイルスが 48 株、パレコウイルスが 1 株、アデノウイルスが 6 株分離された。

2. 年齢別のウイルス分離率

Table 2 に年齢別のウイルス分離率を示した。分離率は 1 歳児が 19% で最も高く、4 歳, 5 歳, 6 歳の分離率と 1% 水準で有意差が認められた。2002~2006 年のポリオ感染源調査の全国結果⁴⁾も、1 歳児が 22% で最も高く、次いで 0 歳が 18%, 2 歳 17%, 3 歳 12% となっており、兵庫県の調査結果とほぼ同様の傾向を示していた。ウイルス分離率が 1 歳でピークを示した理由として、生後半年から 1 歳にかけて移行抗体の低下に伴って、ウイルス感染リスクが高くなるためだと考えられる。

Table 2 Rate of virus isolation by age

Age (Year)	sample	Isolate			Rate of isolation(%)
		Polio virus	Non-Polio	Total	
0	28	—	2	2	7.1
1	116	1	21	22	19.0
2	69	—	9	9	13.0
3	100	—	14	14	14.0
4	79	—	1	1	1.3
5	112	—	6	6	5.4
6	67	—	2	2	3.0
Total	571	1	55	56	9.8

3. 年次別のウイルス分離状況

Table 3 に年次別のウイルスの分離結果を示した。ウイルスの分離数や種類は、検体採取の年によって様々であった。2002 年は 7 種類のエンテロウイルスが検出された。最も多く分離されたのはコクサッキーウイルス B4 型で、このウイルスは 2005 年にも 4 株分離された。米国ではコクサッキーウイルス B4 型は、パレコウイルス 1 型 (旧エコーウイルス 22 型) とともに、他のエンテロウイルス株に比べて死亡例からの検出率が高かったと報告されている⁷⁾。2003 年は 8 年間で最も多い 17 株のウイルスが分離され、そのうち 16 株がエコーウイルス 6 型であった。この年、エコーウイルス 6 型は無菌性髄膜炎患者からも全国的に多く検出された。2007 年は分離された 10 株のうち 7 株がエコーウイルス 25 型であった。エコーウイルス 25 型は 2005 年と 2006 年のポリオ感染源調査でも全国的に多く分離されたが、無菌性髄膜炎患者からの検出率は低かった。

エンテロウイルスの感染は、ウイルスの血清型や感染

者の感受性によって、不顕性感染で終わるものから、無菌性髄膜炎や致死的な症状を引き起こすものまで様々である。本調査では健康な小児を対象としているため、ウイルスが分離された児童は不顕性感染あるいは潜伏期間であったと推測される。1 歳児では 19% からウイルスが分離されており、1 歳児の約 5 人に 1 人がウイルスに感染しているとなると、これらの児童が他の感受性児の感染源となって、地域や集団内でウイルスの循環が起きていることも考えられる。

4. ポリオウイルス分離株の解析

56 の分離株中ポリオウイルスは 2002 年に分離された 1 株だけであった。このウイルスが分離された 1 歳男児は 2002 年 5 月にワクチン接種を受けており、今回の調査における採便は 2002 年 10 月であった。分離株は、中和試験でポリオウイルス 3 型と同定され、PCR-RFLP 法による型内株鑑別から、通常ワクチン株であった。2002 年は本県で分離されたポリオウイルスを含め、全国で 8 株のポリオウイルスが分離されたが、すべてワクチン株で、ワクチンに由来するポリオ症例の報告もなかった⁴⁾。2003 年以降兵庫県のポリオ感染源調査では、ポリオウイルスは分離されなかった。2002 年から 2009 年における兵庫県の調査では、野生株ポリオウイルスおよび VDPV は検出されなかった。近年、経口生ワクチンによるワクチン関連ポリオ様麻痺と VDPV に由来するポリオ流行のリスクを低下させるため、不活化ワクチン導入の必要性が指摘されている⁸⁾。不活化ワクチンの導入にはポリオ流行の有無が重要となるため、今後も継続して野生株ポリオウイルスの輸入を監視し、感染源調査等

Table 3 Results of virus isolation by year

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Poliovirus (1)		Polio 3 (1)						
Non-Poliovirus								
Enterovirus (48)		Cox.A 5 (1) Cox.A 16 (3) Cox.B 1 (2) Cox.B 4 (5) Echo 11 (2) Echo 13 (1)	Cox.A 9 (1) Echo 6 (16) Echo 18 (2)	Echo 6 (1) Echo 18 (2)	Cox.B 4 (4)		Echo 25 (7) Echo 30 (1)	Cox.B 2 (1) Echo 11 (1)
Human parechovirus (1)				HpeV-1 (1)				
Adenovirus (6)						AD 2 (2)	AD 3 (4)	
Total	56	15	17	3	5	0	10	4

- ・ () shows the number of isolated viruses
- ・ Cox.A: Coxsackievirus, group A Cox.B: Coxsackievirus, group B
- Echo: Enteric Cytopathogenic Human Orphan virus
- HpeV-1: Human parechovirus 1 (formerly Echo 22)
- AD: Adenovirus

による病原体サーベイランスや疾病サーベイランスによるポリオサーベイランスを行う必要がある。

IV 要 旨

ポリオ感染源調査は、感染症流行予測調査事業の一環として野生株ポリオウイルスおよびVDPVの輸入・伝播がないことを確認する目的で毎年実施されている。県内で2002年から2009年の8年間に0～6歳の健常児571名から糞便検体を採取し、ウイルス分離を行った結果、56株のウイルスが分離された。56株中ポリオウイルスは1株で、通常のワクチン株であった。その他にエンテロウイルスが48株、パレコウイルスが1株、アデノウイルスが6株分離された。年齢別にみると、1歳児の分離率が最も高く19%であった。2002年から2009年における兵庫県でのポリオ感染源調査では野生株ポリオウイルスおよびVDPVは検出されなかった。

謝 辞

調査にご協力いただいた兵庫県健康福祉部健康局疾病対策課、各健康福祉事務所の皆様方ならびに検体採取にご協力いただいた関係機関の皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) WHO: Wild Poliovirus Weekly Update
<http://www.polioeradication.org/casecount.asp>

- 2) CDC: Wild poliovirus type 1 and type 3 importations -15 countries, Africa, 2008-2009. *MMWR*, **58** (14) , 357-362 (2009)
- 3) 清水博之, 吉田弘, 宮村達男: 野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関するWHO世界的行動計画第2版. *ウイルス*, **55** (1), 161-178 (2005)
- 4) 厚生労働省健康局結核感染症課 国立感染症研究所感染症情報センター: 平成14年度, 15年度, 16年度, 17年度, 18年度 感染症流行予測調査報告書, 8-17(2002), 8-18(2003), 8-18(2004), 8-19(2005), 8-15 (2006)
- 5) 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所感染症流行予測調査事業委員会: ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル. 感染症流行予測調査事業検査術式, 平成14年6月
- 6) 石古博昭, 島田康司, 輿那覇麻理, 栄賢司: 遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定. *臨床とウイルス*, **17**, 283-293 (1999)
- 7) Nino, K., Ashley, L. F., Steven, O., and Mark, A.P. : Enterovirus Surveillance-United State, 1970-2005, *MMWR*, **55** (SS08), 1-20 (2006)
- 8) ポリオおよび麻しんの予防接種に関する検討小委員会: 今後のポリオおよび麻しんの予防接種に関する提言, 厚生科学審議会感染症分科会感染症部会, 第7回ポリオ及び麻しんの予防接種に関する検討小委員会資料 (2003)